

说明书摘要

抗病毒和抗肿瘤的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸

本发明提供了系列含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，它们由含一个或多个 CpG 的脱氧寡核苷酸单链 DNA 分子构成，其能够刺激人外周血单个核细胞（PBMC）杀伤人的白血病细胞和刺激人外周血单个核细胞产生 α 干扰素；以及这些含 CpG 单链脱氧寡核苷酸用于制备治疗肿瘤性疾病和病毒感染性疾病的药物的用途。

Artificial CpG-containing single-stranded oligodeoxynucleotides against viruses and tumors.

The invention provides a series of artificial CpG-containing single-stranded oligodeoxynucleotides (ODNs), each of which consists of single-stranded oligodeoxynucleotide DNA molecule containing one or more CpG(s), wherein the ODNs can stimulate human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) to kill leukemia cells and to produce IFN- α . Those CpG containing single-stranded oligodeoxynucleotides can be used in the compositions to treat tumors and infectious diseases.

权 利 要 求 书

- 1、 含 CpG 单链脱氧核苷酸，它们由含一个或多个 CpG 的寡核苷酸单链 DNA 分子构成。
- 2、 按照权利要求 1 所述的单链脱氧核苷酸，它们的磷酸二酯键可以是非硫化的，部分硫化的，也可以是完全硫化的。
- 3、 按照权利要求 1 所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸，它们具有 SEQ ID NO: 1-107 任一所示的序列。
- 4、 按照权利要求 1-3 中任一项所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸用于制备用于激活人外周单个核细胞杀伤人白血病细胞的药物的用途。
- 5、 按照权利要求 1-3 中任一项所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸用于制备用于诱导人外周单个核细胞产生 α 干扰素的药物的用途。
- 6、 按照权利要求 1-3 中任一项所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸用于制备用于治疗肿瘤性疾病的药物的用途。
- 7、 按照权利要求 1-3 中任一项所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸用于制备用于治疗病毒感染性疾病的药物的用途。

说明书

抗病毒和抗肿瘤的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸

5

发明领域

本发明涉及数种含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，特别是涉及对肿瘤性疾病和病毒感染性疾病具有治疗作用的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，以及这些含 CpG 单链脱氧寡核苷酸用于制备治疗肿瘤性疾病和病毒感染性疾病的药物的用途。

10

发明背景

100 多年前，Coley 在世界上第一个开展了应用细菌提取物治疗细菌感染性疾病的实验，他得出结论：细菌的提取物是一种可以用于治疗传染性疾病的制剂。

15

1984 年，Tokunaga T 等发现从卡介苗（BCG）提取的 DNA 能抑制多种动物肿瘤的生长，具有激活人外周血单个核细胞和小鼠脾脏天然杀伤（NK）细胞的活性，诱导干扰素（IFN）的产生。非脊椎动物的 DNA 有上述功能，脊椎动物和植物的 DNA 则不然，这些功能依赖于 DNA 分子中 CpG 结构(Tokunaga T, Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG.I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity, JNCI, 72:955. 1984)。

20

CpG 是由胞嘧啶和鸟嘌呤通过磷酸连接成的二核苷酸。C 代表胞嘧啶，G 代表鸟嘌呤，p 代表磷酸，胞嘧啶位于 5'端。多种具有 CpG 结构的细菌和病毒 DNA 对脊椎动物的免疫系统均为危险的信号，可激活多种免疫细胞启动对细菌和病毒的抵抗机制。近年来的研究表明，人工合成的含一个或多个 CpG 的寡核苷酸单链 DNA（CpG ODN）也可表现强效的免疫增强和免疫调节作用。CpG ODN 可强力增强 B 细胞、T 细胞、NK 细胞、抗原提呈细胞（单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞）和中性粒细胞的功能，表现出明显的临床应用前景(Weiner GJ, The

25

30

immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *J Leukoc Biol* 2000 Oct; 68(4):455-63)。

由于序列，尤其是 CpG 两侧的序列的不同，CpG ODN 可有多种多样的形式，表现不同性质、不同强度的免疫增强和免疫调节作用。有些
 5 CpG ODN 可表现出种属依赖性，即对一种动物表现免疫增强功能的 CpG ODN，在另一种动物或人则未必表现出同样的或等效的免疫增强功能
 (Kamstrup S, et al. Response of porcine peripheral blood mononuclear cells to CpG-containing oligodeoxynucleotides, *Vet Microbiol* 2001 Feb 26; 78(4)352-62; Gunther Hartmann, et al. Delineation of a CpG Phosphorothioate
 10 Oligodeoxynucleotide for Activating Primate Immune Responses In Vitro and In Vivo¹ *The Journal of Immunology*, 2000, 164: 1617-1624)。

CpG-DNA 具有广泛的免疫调节作用。CpG-DNA 作用于 TLR-9，对巨噬细胞、树突状细胞和 B 细胞有很强的刺激作用。CpG 是细菌感染引起炎症的重要因子。原发小胶质细胞表达 TLR-9 mRNA。在体外 CpG-DNA
 15 激活小胶质细胞产生 TNF- α ，IL-12p40，IL-12p70 和 NO。此外，还可上调 MHC II 类分子，使 B7-1，B7-2 和 CD40 分子上调，吞噬活性增强。脑室内注射 CpG-DNA，刺激小胶质细胞表达 TNF- α 和 IL-12p40 mRNA
 (Alexander H. Dalpke et al. Immunostimulatory CpG-DNA Activates Murine Microglia¹ *The Journal of Immunology*, 2002, 168: 4854-4863)。

20 PDC 和 B 细胞(而非单核细胞 (monocytes)), NK 细胞或 T 细胞是外周血 CpG ODN 的靶细胞。TLR9 是 PDC 和 B 细胞识别 CpG ODN 的受体 (Veit Hornung, et al. Quantitative Expression of Toll-Like Receptor 1-10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides¹ *The Journal of Immunology*, 2002,
 25 168: 4531-4537)。

在人的外周血单个核细胞中有天然杀伤细胞(NK)。NK 是一类无吞噬作用的非粘附性细胞，胞质内有许多嗜苯胺颗粒，是一种起源于骨髓的大颗粒淋巴细胞。具有广谱的抗肿瘤作用，能杀伤同系、同种及异种的肿瘤细胞，尤其对淋巴瘤和白血病最为有效。

干扰素（interferon, IFN）是最先发现的细胞因子。I 型干扰素是一种重要的抗病毒细胞因子。受到病毒感染的细胞可合成和分泌 IFN，这些 IFN 可刺激邻近的细胞合成抑制 RNA 及 DNA 病毒复制的酶类使其进入抗病毒状态，从而使这些细胞受到保护。

5

发明内容

发明概述

本发明的目的之一是提供系列含 CpG 单链脱氧核苷酸，特别是刺激人天然杀伤细胞活性和诱生 α 干扰素的含 CpG 单链脱氧核苷酸。它们由含一个或多个 CpG 的寡核苷酸单链 DNA 分子构成，其磷酸二酯键可以是部分硫化的，全部硫化的，也可以是未硫化的。

10

优选地，本发明的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸具有 SEQ ID NO: 1-95 所示的序列。

15

本发明的目的之二是提供本发明的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸用于制备治疗肿瘤性疾病和病毒感染性疾病的药物的用途。

另外，需要指出的是，在本申请的上下文的公开内容的基础上，本发明的其它具有实质性特点的方面和创造性的有益效果对本领域的普通技术人员来说是可以直接推知的。

具体实施方式

20

在本发明的上下文中，所使用的术语除非另外说明，一般具有本领域的普通技术人员通常理解的含义。特别地，下列术语具有如下的含义：

优选地，本发明的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸具有如下所示的序列：

101 5'-TcgTCgAgggCgCCggTgAC-3'

25

102 5'-TCgTCgCCggTgggggTgTg-3'

103 5'-TCgTCgTACgCAATTgTCTT-3'

104 5'-TCgCCTCgTCgCCTTCgAgC-3'

201 5'-TCgCCCACCggTgggggggg-3'

202 5'-TCgTCgCAgACCggTCTgggg-3'

30

203 5'-gggggACgTCgCCggggggg-3'

	204	5'-ggATCCgTACgCATggggggg-3'
	205	5'-TCgTCgCggCCggCgCCCCC-3'
	206	5'-TCgTCgCggCCgCgAgggggg-3'
	301	5'-TCgTCgTTACCgATgACgTCgCCgT-3'
5	302	5'-TCgTCgggTgCgACgTCgCAggggggg-3'
	303	5'-TCgTCgggTgCgACgATCgTCggggggg-3'
	304	5'-TCgTCgTTTgCATCgATgCAgTCgTCgTT-3'
	305	5'-TCgTCgTTTgCATCgATgCAggggggg-3'
	306	5'-ACCggTATCgATgCCggTggggggg-3'
10	307	5'-ggggTCCATgACgTTCCTgAAggggggg-3'
	308	5'-TCgTCgTTTTgACgATCgTCggggggg-3'
	309	5'-TTCgTCgTTTgATCgATgTTCgTTggggggg-3'
	310	5'-TTCgTCgTTgTgATCgATggggggg-3'
	311	5'-TATCgATgTTTTgTCgTCgTTggggggg-3'
15	312	5'-TTCgTTgCATCgATgCATCgTTggggggg-3'
	313	5'-TTCgCTTCgCTTTTCgCTTCgCTT-3'
	601	5'-TCgAggACAAgATTCTCgTgC-3'
	602	5'-TCgAggACAAgATTCTCgTgCAggCC-3'
	603	5'-TCgTgCAggCCAACgAggCCg-3'
20	604	5'-ACCgCCAAggAgAAgCCgCAggAggg-3'
	605	5'-TCgTTgCCgTCggCCC-3'
	606	5'-TACAACggCgAggAATACC-3'
	607	5'-TCggCACgCgACgTgCTggCCgTCgTTTCC-3'
	608	5'-gTACAACggCgAggAATACCT-3'
25	609	5'-ACCgTCgTTgCCgTCggCCC-3'
	610	5'-TgCTggCCgTCgTT-3'
	611	5'-gTCggCACgCgACg-3'
	612	5'-gTCggCACgCgACggggggg-3'
	613	5'-gTCggCACgCgACgCCCCCC-3'
30	614	5'-TCgTTgCCgTCggCCCCCCCCC-3'

	615	5'-TCgTTgCCgTCggCCCCCC-3'
	616	5'-TCgTTgCCgTCggCCCCC-3'
	617	5'-TCgTTgCCgTCggCCCC-3'
	618	5'-TCgTTgCCgTCggCCCCCCC-3'
5	619	5'-TCgTTgCCgTCgg-3'
	620	5'-TCgTTgCCgTCggg-3'
	621	5'-TCgTTgCCgTCgggg-3'
	622	5'-TCgTTgCCgTCggggg-3'
	623	5'-TCgTTgCCgTCgggggg-3'
10	624	5'-TCgTTgCCgTCggggggg-3'
	625	5'-TCgTTgCCgTCgggggggg-3'
	626	5'-TCgTTgCCgTCggggggggg-3'
	627	5'-TCgAggACAAGATTCTCgT-3'
	628	5'-TCCCgCTggACgTT-3'
15	629	5'-TCggCACgCgACgTgCTggCCgTCgTT-3'
	631	5'-TCgTCgCgCCgTCACggggggg-3'
	632	5'-TCgTgTgCgTgCCgTTggg-3'
	633	5'-TCgTCgCCgTTgggCggg-3'
	634	5'-TCgTCgACgTCgTTgggCggg-3'
20	635	5'-TCgCAgTTgTCgTAACgTTgggCggg-3'
	636	5'-TTACCggTTAACgTTggCCggCC-3'
	637	5'-ACCggTTAACgTTgTCCCCgggg-3'
	638	5'-TCgTCgTTggTATgTT-3'
	639	5'-TCgTCgTCgTCgTTgTCgTT -3'
25	640	5'-TCgTCgTCgTCgTTgTCgTTgggg-3'
	641	5'-TCgTTCggggTgCCg-3'
	642	5'-TCgTTCggggTAACgATT-3'
	643	5'-TCgTTCggggTAACgTT-3'
	644	5'-TCgTTCggggTACCgAT -3'
30	645	5'-TCgTTCggggTACCgATgggg-3'

646 5'-TCgTTgCgCTCCCATgCCggggggg-3'
 647 5'-TCgTCgTTTCgTCgTTggggg-3'
 648 5'-TCgTTgTCgTTTCgCTgCCggCgggggg-3'
 649 5'-CgTTgACgATCgTCCCATggCggg-3'
 5 650 5'-TCTgCggCCTTCgTCg-3'
 651 5'-TAgTAACCggTCCggCgCCCCC-3'
 652 5'-TTgCAgCgCTgCCggTggg-3'
 653 5'-TCgTACggCCgCCgTACggCggg-3'
 654 5'-CggCCCATCgAgggCgACggC-3'
 10 655 5'-TCgCgTCgACTCCCCTCgAgggg-3'
 656 5'-TCgTCgTCgACTCgTggTCggggg-3'
 657 5'-TCgggCgCCCgATCggggggg-3'
 658 5'-TCgTCggTCTTTCgAAATT-3'
 659 5'-TCgTgACgTCCTCgAgTT-3'
 15 660 5'-ggACgATCgATCgTggggggg-3'
 661 5'-gggATgCATCgATgCATCggggggg-3'
 662 5'-gggggAATCgATTcggggggg-3'
 663 5'-ggTgCgACgTCgCAggggggg-3'
 664 5'-TCgTCgggTgCATCgATgCAggggggg-3'
 20 665 5'-ggTgCATCgTACgATgCAggggggg-3'
 666 5'-gggACgTACgTCggggggg-3'
 667 5'-TCggggACgATCgTCggggggg-3'
 668 5'-gggggATCgATATCgATCggggggg-3'
 669 5'-gggggATCgACgTCgATCggggggg-3'
 25 670 5'-ggTgCATCgATCgATgCAggggggg-3'
 671 5'-ggATCgATCgATCgATggggggg-3'
 672 5'-ggCgATCgATCgATCggggggg-3'
 673 5'-ggggTCgATCgATCgAggggggg-3'
 674 5'-ggTgCgATCgATCgCAggggggg-3'
 30 675 5'-ggTCgCgATCgCgAggggggg-3'

- 676 5'-TCgTCTTTCgACTCgTTCTC-3'
 677 5'-TCgTCgTTTTgCgTTCTC-3'
 678 5'-TCATCgACTCTCgAgCgTTC-3'
 679 5'-ATCgTCgACTCTCgTgTTCTC-3'
 5 680 5'-TCgACTTTCgTCgTTCTgTT-3'
 681 5'-TCgTCgTTTCgTCgTTCTC-3'
 682 5'-TCgTCgTCgTCgTTgTCgTT-3'
 683 5'-TCgTTCTCgACTCgTTCTC-3'
 684 5'-TCgACgTTCgTCgTTCgTCgTTC-3'
 10 685 5'-TCgTCgACgTCgTTCgTTCTC-3'

其中的磷酸二酯键可以是部分硫化的，全部硫化的，也可以是未硫化的。

本发明的CpG单链脱氧核苷酸可通过已知的方法生产，例如采用固相亚磷酰胺三酯法进行生产。以下的实施例详细地例举了一种生产本发明的CpG单链脱氧核苷酸的方法。

- 15 在这些含CpG单链脱氧寡核苷酸用于制备用于制备治疗肿瘤性疾病和病毒感染性疾病的药物的用途中，与治疗肿瘤性疾病和病毒感染性疾病的药物的使用量的比例为1:1-100:1(摩尔比)。

- 本发明的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的使用方式包括单独应用、两种或两种以上的 CpG 单链脱氧寡核苷酸联合应用、与治疗肿瘤性疾病和病毒感染性疾病的药物混合使用, 与治疗肿瘤性疾病和病毒感染性疾病的药物通过交联剂共价偶联使用；

应用方式包括皮下应用、鼻腔粘膜应用、肌肉应用、胃肠应用、腹腔应用、静脉注射等常用的方式。

- 25 CpG 单链脱氧寡核苷酸使用时间可在使用治疗肿瘤性疾病和病毒感染性疾病的药物之前应用、与治疗肿瘤性疾病和病毒感染性疾病的药物同时应用、在治疗肿瘤性疾病和病毒感染性疾病的药物后应用。

在小鼠试验中 CpG 单链脱氧寡核苷酸的使用量为 0-500 微克/小鼠，如进行人体试验则按标准的换算方法进行换算。

- 30 下面结合具体的制备实施例和生物学效果实施例，并参照数据进一步详细地描述本发明。应理解，这些实施例只是为了举例说明本发明，

而非以任何方式限制本发明的范围。

实施例

在如下实施例中，未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的
5 常规方法，例如合成采用固相亚磷酰胺三酯法。

在如下实施例中，所用试剂的来源、商品名和/或有必要列出其组成成分者，均只标明一次。在其后所用相同试剂如无特殊说明，不在赘述上述内容。

10 实施例 1 CpG 单链脱氧核苷酸的制备（上海生工合成）

合成采用固相亚磷酰胺三酯法，合成方法（上海生工提供）如下：

材料和方法：

三氯乙酸(Trichloroacetic Acid, TCA)、可控多孔玻璃(Controlled
Pore Glass)、DMT(二甲氧基三苯甲基)、四氮唑活化剂、乙酸酐、N-
15 甲基咪唑、ABI DNA 合成仪、高效液相色谱层析仪等。

A、T、C、G 四种核苷酸单体：合成所用单体为核苷亚磷酰胺，是经过化学修饰的核苷酸，含下面几个功能基团：

1. 3' 位 P 上二异丙胺基，缩合所用的功能基
2. 3' 位 P 上苄乙基，保护基，合成完毕后脱去。
- 20 3. 5' -Dmt，保护基，缩合前脱去。
4. A 和 C 的杂环氨基上的苯甲酸保护基，合成完毕后脱去。
5. G 上嘌呤环氨基上的异丙酰保护基，合成完毕后脱去。

具体的反应步骤如下：

一、脱保护基

25 用三氯乙酸(Trichloroacetic Acid, TCA)脱去连结在可控多孔玻璃(Controlled Pore Glass)上的核苷酸的保护基团二甲氧基三苯甲基(DMT)，获得游离的 5' -羟基端，以供下一步缩合反应。

二、活化

将亚磷酰胺保护的核苷酸单体与四氮唑活化剂混合并进入合成柱，
30 形成亚磷酰胺四唑活性中间体(其 3' -端已被活化，但 5' -端仍受 DMT 保

护)，此中间体将与可控多孔玻璃上的已脱保护基的核苷酸发生缩合反应。

三、连接

5 亚磷酰胺四唑活性中间体遇到可控多孔玻璃上已脱保护基的核苷酸时，将与其 5'-羟基发生亲合反应，缩合并脱去四唑，此时合成的寡核苷酸链向前延长一个碱基。

四、封闭

10 缩合反应后为了防止连在可控多孔玻璃上的未参与反应的 5'-羟基在随后的循环反应中被延伸，常通过乙酰化来封闭此端羟基，一般乙酰化试剂是用乙酸酐和 N-甲基咪唑等混合形成的。

五、氧化

15 缩合反应时核苷酸单体是通过亚磷酸酯键与连在可控多孔玻璃上的寡核苷酸连接，而亚磷酸酯键不稳定，易被酸、碱水解，此时常用碘的四氢呋喃溶液将亚磷酸酯转化为磷酸三酯，得到稳定的寡核苷酸。
20 经过以上五个步骤后，一个脱氧核苷酸就被连到可控多孔玻璃的核苷酸上，同样再用三氯乙酸脱去新连上的脱氧核苷酸 5'-羟基上的保护基团 DMT 后，重复以上的活化、连接、封闭、氧化过程即可得到一 DNA 片段粗品。最后对其进行切割、脱保护基（一般对 A、C 碱基采用苯甲酰基保护；G 碱基用异丁酰基保护；T 碱基不必保护；亚磷酸用膦乙基保护）、
25 纯化（常用的有 HAP，PAGE，HPLC，C18，OPC 等方法）、定量等合成后处理即可得到符合实验要求的寡核苷酸片段。

未硫化的 CpG 单链脱氧寡核苷酸在 ABI 3900 DNA 合成仪上合成（上海生工生物技术有限公司），全硫化及部分硫化 CpG 单链脱氧寡核苷酸的合成采用置换法，在 ABI 394 DNA 合成仪上合成（上海生工生物
25 技术有限公司）。

实施例 2 人外周血单个核细胞杀伤人白血病细胞（K562 细胞）

一、K562 细胞的培养

试剂和材料：

30 K562 细胞：为人的白血病细胞株（美国 ATCC CCL-243）。

至 10 毫升离心管中，水平离心机以 1,000 X g 离心力离心 3min，弃上清，冻存液 1 毫升，滴管轻轻吹打均匀，转移至冻存管中，梯度降温（降温 1℃/1—2h），降至 -70℃ 左右，然后，转移到液氮罐中。

5 二、人外周血单个核细胞的分离

1、试剂和材料：

肝素抗凝的人全血：长春市中心血站。

聚蔗糖-泛影葡胺：比重 1.077±0.001，北京鼎国生物技术有限公司。

10 细胞培养常用的仪器设备：低温冰箱、二氧化碳孵箱、超净工作台、倒置显微镜、液氮罐、蒸馏水器、真空泵、细胞培养瓶、滤菌器、滤过瓶、各种规格的吸管、加样器、滴管、血球计数板、水平式离心机等。

RPMI1640 培养液：

15	含 L-谷氨酰胺的 RPMI1640 (GIBCOBRL)	10.4 克
	碳酸氢钠	2.0 克
	庆大霉素	10 万单位
	加三蒸水至体积 1000 毫升	
	0.22 微米的滤膜真空泵抽滤除菌、分装。	

20 小牛血清灭活：小牛血清 (Invitrogen) -20℃ 取出，4℃ 冰箱融化后，56℃ 水浴 30min。

10% 小牛血清的 RPMI1640：

灭活的小牛血清	10 毫升
RPMI 1640 培养液	90 毫升

Hank's 液（无钙离子、镁离子）的配制：

25	氯化钠	8.0 克
	氯化钾	0.4 克
	磷酸氢二钠（带一个结晶水）	0.06 克
	磷酸二氢钾	0.06 克
	碳酸氢钠	0.35 克
30	葡萄糖	1.0 克

酚红 0.02 克

加入双蒸水至 1000 毫升。

将上列成分混合后溶化，8 磅 15min 灭菌，4℃冰箱保存。临用时用 7.4% NaHCO₃ 调 pH 至 7.3~7.6。

5 2%台盼兰染色液：

台盼兰	2 克
生理盐水	100 毫升

2、方法：

10 肝素抗凝的人外周血缓慢沿管壁缓慢加于比重为 1.077 ± 0.001 的聚蔗糖-泛影葡胺淋巴细胞分层液面上，分离液与外周血的比例约为 2:1。

水平离心机离心 1,000xg 15—20min，离心后管内分为 3 层，用吸管吸取白色云雾层狭窄带，置入另一管中。

加入等倍或以上体积的 Hank's 液（无血清），800—1,000 xg 10-15min，弃上清，加入 Hank's 液，洗涤细胞两次。

末次离心后，弃上清，加入培养基 2ml，重悬细胞。

取一滴细胞悬液与一滴 0.2%台盼兰染液混合，于血球计数板计数四个大方格内的细胞总数，单个核细胞浓度(细胞数 / 1 毫升细胞悬液) = 4 个大方格内细胞总数 / $4 \times 10^4 \times 2$ (稀释倍数)。

20 三、K562 细胞的标记

试剂和材料：

细胞培养常用的仪器设备：低温冰箱、二氧化碳孵箱、超净工作台、倒置显微镜、液氮罐、蒸馏水器、真空泵、细胞培养瓶、各种规格的吸管、加样器、滴管等。

25 放射性同位素：镅 51 (⁵¹Cr) (美国 PerkinElmer 公司)

γ 射线计数器 (美国 Beckman 公司)、同位素标记管
RPMI1640 培养液：

含 L-谷氨酰胺的 RPMI1640 (GIBCOBRL)	10.4 克
碳酸氢钠	2.0 克
庆大霉素	10 万单位

加三蒸水至体积 1000 毫升

0.22 微米的滤膜真空泵抽滤除菌、分装。

小牛血清灭活：小牛血清 (Invitrogen) -20°C 取出， 4°C 冰箱融化后， 56°C 水浴 30min。

5 10% 小牛血清的 RPMI1640:

灭活的小牛血清 10 毫升

RPMI 1640 培养液 90 毫升

方法:

1. 取生长良好的 K562 细胞，吸管吹打均匀后吸到 10 毫升离心管中，
10 水平离心机以 $800 \times g$ 离心力离心 5min，弃上清，加入 1 毫升培养基，吸管吹打均匀，取少量计数，调节细胞浓度为 1×10^7 个 / 毫升。
2. 吸取 100 微升 (1×10^6 个细胞) 放入塑料管中，加入 100 微升放射性同位素 ^{51}Cr 。
- 15 3. 放入 37°C 5% 二氧化碳孵箱中培养 1h，每隔 5—8min 混匀一次。
4. 用 10% 小牛血清的 RPMI1640 洗涤三次，然后 10% 小牛血清的 RPMI1640 重悬细胞。

四、杀伤 K562 细胞的实验

试剂和材料:

- 20 细胞培养常用的仪器设备：低温冰箱、二氧化碳孵箱、超净工作台、倒置显微镜、液氮罐、蒸馏水器、真空泵、细胞培养瓶、各种规格的吸管、加样器、滴管等。

RPMI1640 培养液:

- | | | |
|----|-------------------------------|--------|
| 25 | 含 L-谷氨酰胺的 RPMI1640 (GIBCOBRL) | 10.4 克 |
| | 碳酸氢钠 | 2.0 克 |
| | 庆大霉素 | 10 万单位 |
| | 加三蒸水至体积 1000 毫升 | |

0.22 微米的滤膜真空泵抽滤除菌、分装。

- 30 小牛血清灭活：小牛血清 (Invitrogen) -20°C 取出， 4°C 冰箱融化后， 56°C 水浴 30min。

10%小牛血清的 RPMI1640:

灭活的小牛血清 10 毫升

RPMI 1640 培养液 90 毫升

TE 缓冲液: 10 毫摩尔 Tris, 1 毫摩尔 EDTA, 盐酸调节 pH 值 7.0。

5 1 摩尔 / 升的盐酸: 盐酸 10 毫升, 加三蒸水至终体积 100 毫升

方法:

1. 用 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基调节人外周血单个核细胞至终浓度为 2×10^6 个 / 毫升, 96 孔板每孔加入 100 微升, 即每孔细胞数为 2×10^5 个。
- 10 2. 加入用 TE 缓冲液稀释的 CpG 单链脱氧核苷酸至每孔终浓度 120 微克 / 毫升, 每种 CpG 单链脱氧核苷酸三个复孔, 设一不加 CpG 单链脱氧核苷酸的对照孔。
3. 设最大释放孔 6 复孔, 最大释放组每孔加 100 微升 1 摩尔 / 升的盐酸, 自发释放孔 6 复孔, 每孔加 100 微升 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基, 混匀。
- 15 4. 37°C 5%二氧化碳孵箱中培养至 18h。取标记好的 K562 细胞, 用 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基调节细胞浓度至 1×10^5 个 / 毫升。
5. 在 96 孔板中每孔加 100 微升, 设最大释放组和自发释放组, 37°C 5%二氧化碳孵箱中培养 4h。
- 20 6. 水平离心机 1,000 X g 离心 5min 每孔取上清 150 微升, 加入塑闪瓶中, 再加 3—5 毫升液闪液, 测量 CPM 值。
7. 计算杀伤率: 杀伤率 = (实验组 CPM 值 - 自发释放组 CPM 值) / (最大释放组 CPM 值 - 自发释放组 CPM 值) X 100%

25

实验结果(见下表)表明, CpG ODN 对人外周血单个核细胞杀伤 K562 细胞用明显的刺激作用。

第一组实验的结果:

30

序列号	CpG 单链脱氧核苷酸结构	杀伤率 (%)
对照孔	无	17.5
301	5'-TCgTCgTTACCGATgACgTCgCCgT-3'	42.1
302	5'-TCgTCgggTgCgACgTCgCAggggggg-3'	41.2
303	5'-TCgTCgggTgCgACgATCgTCggggggg-3'	46.8
304	5'-TCgTCgTTTgCATCgATgCAgTCgTCgTT-3'	35.7
305	5'-TCgTCgTTTgCATCgATgCAggggggg-3'	43.1
306	5'-ACCGgTATCgATgCCggTggggggg-3'	55.6
307	5'-ggggTCCATgACgTTCCTgAAggggggg-3'	27.8
308	5'-TCgTCgTTTTgACgATCgTCggggggg-3'	35.8
309	5'-TTCgTCgTTTgATCgATgTTCgTTggggggg-3'	33.4
310	5'-TTCgTCgTTgTgATCgATggggggg-3'	48.1
311	5'-TATCgATgTTTTgTCgTCgTTggggggg-3'	46.0
312	5'-TTCgTTgCATCgATgCATCgTTggggggg-3'	28.2
313	5'-TTCgCTTCgCTTTTCgCTTCgCTT-3'	27.8
序列号	CpG 单链脱氧核苷酸结构	杀伤率 (%)
601	5'-TCgAggACAAGATTCTCgTgC-3'	60.1
602	5'-TCgAggACAAGATTCTCgTgCAggCC-3'	21.7
603	5'-TCgTgCAggCCAACgAggCCg-3'	77
604	5'-ACCGCCAAGgAgAAgCCgCAggAggg-3'	81
605	5'-TCgTTgCCgTCggCCC-3'	103
606	5'-TACAACggCgAggAATACC-3'	78
607	5'-TCggCACgCgACgTgCTggCCgTCgTTTCC-3'	91
608	5'-gTACAACggCgAggAATACCT-3'	99
609	5'-ACCGTCgTTgCCgTCggCCC-3'	88

610	5'-TgCTggCCgTCgTT-3'	73
611	5'-gTCggCACgCgACg-3'	76
612	5'-gTCggCACgCgACggggggg-3'	61
613	5'-gTCggCACgCgACgCCCCCC-3'	51
614	5'-TCgTTgCCgTCggCCCCCCCC-3'	45
615	5'-TCgTTgCCgTCggCCCCC-3'	68
616	5'-TCgTTgCCgTCggCCCCC-3'	110
617	5'-TCgTTgCCgTCggCCCC-3'	94.5
618	5'-TCgTTgCCgTCggCCCCCCC-3'	65.5
619	5'-TCgTTgCCgTCgg-3'	65.8
620	5'-TCgTTgCCgTCggg-3'	90.8
621	5'-TCgTTgCCgTCgggg-3'	72.3
622	5'-TCgTTgCCgTCggggg-3'	36.1
623	5'-TCgTTgCCgTCgggggg-3'	68.1
624	5'-TCgTTgCCgTCggggggg-3'	77.3
625	5'-TCgTTgCCgTCgggggggg-3'	79.3
626	5'-TCgTTgCCgTCggggggggg-3'	46.7
627	5'-TCgAggACAAgATTCTCgT-3'	38.3
628	5'-TCCCgCTggACgTT-3'	62.3
629	5'-TCggCACgCgACgTgCTggCCgTCgTT-3'	67.5

序列号	CpG 单链脱氧核苷酸结构	杀伤率 (%)
631	5'-TCgTCgCgCCgTCACggggggg-3'	53.2
632	5'-TCgTgTgCgTgCCgTTggg-3'	67.2
633	5'-TCgTCgCCgTTgggCggg-3'	86.6
634	5'-TCgTCgACgTCgTTgggCggg-3'	67.4
635	5'-TCgCAgTTgTCgTAACgTTgggCggg-3'	62.4
636	5'-TTACCggTTAACgTTggCCggCC-3'	61.9
637	5'-ACCggTTAACgTTgTCCCCggggg-3'	64.2

638	5'-TCgTCgTTggTATgTT-3'	65.2
639	5'-TCgTCgTCgTCgTTgTCgTT -3'	66.7
640	5'-TCgTCgTCgTCgTTgTCgTTgggg-3'	71.1
641	5'-TCgTTCggggTgCCg-3'	63.4
642	5'-TCgTTCggggTAACgATT-3'	66.3
643	5'-TCgTTCggggTAACgTT-3'	57.9
644	5'-TCgTTCggggTACCgAT -3'	61.3
645	5'-TCgTTCggggTACCgATgggg-3'	72.5
646	5'-TCgTTgCgCTCCCATgCCgggggg-3'	74.5
647	5'-TCgTCgTTTCgTCgTTgggg-3'	70.2
648	5'-TCgTTgTCgTTTCgCTgCCggCggggg-3'	65.8
649	5'-CgTTgACgATCgTCCCATggCggg-3'	57.9
650	5'-TCTgCggCCTTCgTCg-3'	72.4
651	5'-TAgTAACCggTCCggCgCCCC-3'	66.3
652	5'-TTgCAgCgCTgCCggTggg-3'	78.6
653	5'-TCgTACggCCgCCgTACggCggg-3'	88.1
654	5'-CggCCCATCgAgggCgACggC-3'	81.8
655	5'-TCgCgTCgACTCCCCTCgAgggg-3'	65.8
656	5'-TCgTCgTCgACTCgTggTCggggg-3'	77
657	5'-TCgggCgCCCgATCgggggg-3'	63.3
658	5'-TCgTCggTCTTTCgAAATT-3'	76.6
659	5'-TCgTgACgTCCTCgAgTT-3'	80.9

第二组实验的结果:

编号	序列	杀伤率 (%)
TE	对照组	56.834
660	5'-ggACgATCgATCgTgggggg-3'	68.792
661	5'-gggATgCATCgATgCATCgggggg-3'	74.831
662	5'-gggggAATCgATTCgggggg-3'	66.534

663	5'-ggTgCgACgTCgCAggggggg-3'	64.597
664	5'-TCgTCgggTgCATCgATgCAggggggg-3'	73.803
665	5'-ggTgCATCgTACgATgCAggggggg-3'	69.429
666	5'-gggACgTACgTCggggggg-3'	71.594
667	5'-TCggggACgATCgTCggggggg-3'	67.024
668	5'-gggggATCgATATCgATCggggggg-3'	75.312
669	5'-gggggATCgACgTCgATCggggggg-3'	70.107
670	5'-ggTgCATCgATCgATgCAggggggg-3'	72.119
671	5'-ggATCgATCgATCgATggggggg-3'	70.107
672	5'-ggCgATCgATCgATCggggggg-3'	65.745
673	5'-ggggTCgATCgATCgAgggggg-3'	76.536
674	5'-ggTgCgATCgATCgCAggggggg-3'	70.741
675	5'-ggTCgCgATCgCgAgggggg-3'	77.805

实施例 3 CpG ODN 刺激产生人干扰素 (HIFN α)

本实验采用 PBL Biomedical Laboratories 检测人 IFN α 试剂盒（批号：1755）进行。

5 一. 人外周血单个核细胞的分离

1、试剂和材料：

肝素抗凝的人全血：长春市中心血站。

聚蔗糖-泛影葡胺：比重 1.077 \pm 0.001，北京鼎国生物技术有限公司。

10 细胞培养常用的仪器设备：低温冰箱、二氧化碳孵箱、超净工作台、倒置显微镜、液氮罐、蒸馏水器、真空泵、细胞培养瓶、滤菌器、滤过瓶、各种规格的吸管、加样器、滴管、血球计数板、水平式离心机等。

RPMI1640 培养液：

15 含 L-谷氨酰胺的 RPMI1640 (GIBCOBRL) 10.4 克
碳酸氢钠 2.0 克
庆大霉素 10 万单位
加三蒸水至体积 1000 毫升

0.22 微米的滤膜真空泵抽滤除菌、分装。

小牛血清灭活：小牛血清 (Invitrogen) -20℃ 取出，4℃ 冰箱融化后，56℃ 水浴 30min。

10% 小牛血清的 RPMI1640:

5	灭活的小牛血清	10 毫升
	RPMI 1640 培养液	90 毫升

Hank's 液（无钙离子、镁离子）的配制：

	氯化钠	8.0 克
	氯化钾	0.4 克
10	磷酸氢二钠（带一个结晶水）	0.06 克
	磷酸二氢钾	0.06 克
	碳酸氢钠	0.35 克
	葡萄糖	1.0 克
	酚红	0.02 克

15 加入双蒸水至 1000 毫升。

将上列成分混合后溶化，8 磅 15min 灭菌，4℃ 冰箱保存。临用时用 7.4% NaHCO₃ 调 pH 至 7.3~7.6。

2% 台盼兰染色液：

	台盼兰	2 克
20	生理盐水	100 毫升

2、方法：

肝素抗凝的人外周血缓慢沿管壁缓慢加于比重为 1.077 ± 0.001 的聚蔗糖-泛影葡胺淋巴细胞分层液面上，分离液与外周血的比例约为 2:1。

25 水平离心机离心 1,000 xg 15-20min，离心后管内分为 3 层，用吸管吸取白色云雾层狭窄带，置入另一管中。

加入等倍或以上体积的 Hank's 液（无血清），800-1,000 xg 10-15min，弃上清，加入 Hank's 液，洗涤细胞两次。

末次离心后，弃上清，加入培养基 2ml，重悬细胞。

30 取一滴细胞悬液与一滴 0.2% 台盼兰染液混合，于血球计数板计

数四个大方格内的细胞总数，单个核细胞浓度(细胞数 / 1 毫升细胞悬液) = 4 个大方格内细胞总数 / $4 \times 10^4 \times 2$ (稀释倍数)。人外周血单个核细胞的分离

二. 人干扰素 (HIFN α) 的检测

5 试剂和材料:

细胞培养常用的仪器设备：低温冰箱、二氧化碳孵箱、超净工作台、倒置显微镜、液氮罐、蒸馏水器、真空泵、细胞培养瓶、各种规格的吸管、加样器、滴管等。

RPMI1640 培养液:

- 10 含 L-谷氨酰胺的 RPMI1640 (GIBCOBRL) 10.4 克
碳酸氢钠 2.0 克
庆大霉素 10 万单位
加三蒸水至体积 1000 毫升
0.22 微米的滤膜真空泵抽滤除菌、分装。

- 15 小牛血清灭活: 小牛血清 (Invitrogen) -20°C 取出, 4°C 冰箱融化后, 56°C 水浴 30min。

10%小牛血清的 RPMI1640:

- | | |
|---------------|-------|
| 灭活的小牛血清 | 10 毫升 |
| RPMI 1640 培养液 | 90 毫升 |

- 20 24孔板（平底）（Costar）。

方法:

1. 用 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基调节人外周血单个核细胞至终浓度为 2×10^6 个 / 毫升。
2. 24 孔板每孔加入 1000 微升，即每孔细胞数为 2×10^6 个。加入用 TE 缓冲液稀释的 CpG 单链脱氧核苷酸至每孔终浓度 6 微克 / 毫升。
3. 37℃ 5% 二氧化碳孵箱中培养至 24 小时，收上清 200 微升。
4. 继续培养 24 小时，收上清 200 微升。
5. 采用 PBL Biomedical Laboratories 检测人 IFN α 试剂盒（批号：1755）进行 IFN α 的检测。

30 HIFN α 的检测

试剂准备: A 瓶: 浓缩洗液 (50ml)

B (小) 瓶: HIFN α 标准品 (1.5ml)

C 瓶: 稀释缓冲液 (50 ml)

D (小) 瓶: 抗体浓缩液 (0.25 ml)

5 E (小) 瓶: 辣根过氧化物酶试剂 (HRP) 浓缩液 (20 μ l)

F 瓶: 辣根过氧化物酶试剂 (HRP) 稀释液 (25 ml)

G 瓶: 辣根过氧化物酶底物反应液 (TMB) (25 ml)

H 瓶: 终止液 (25 ml)

10 步骤:

(1) 配制稀释洗液 (工作液)

A (瓶) 液 50 ml

双蒸水 加到 1000 ml 即成工作洗液

15 此工作洗液配制后应存放与 4℃冰箱中, 用前须充分混匀。冲洗步骤均应在室温 (24℃) 下用冷洗液 (2-6℃) 进行冲洗。

(2) 绘制标准曲线

系列稀释 HIFN α 标准品: HIFN α 标准品 (小瓶 B, 1.5ml) 加稀释缓冲液 (C 瓶), 使之配成 0-500 pg/ ml (高敏度) 或 0-5000 pg/ ml (广范围) 系列稀释液。所提供的样品曲线谨供参考。

20 方法: 标记 7 个聚丙烯小管 (分别为 S₆-S₁ 以及 BK), 所有稀释步骤均在其中进行, 枪头须每次更换。干扰素浓度待测的样品亦须用同样方法稀释。

(3) 设计并确定 96 孔微量板上测试样品所需孔数: 建议选 16 个孔用于 HIFN α 标准品。其中空白对照 (BK, 只加缓冲液 BK) 4 个孔, HIFN α 标准品 (S₆-S₁) 12 个孔 (各二复孔)。另选 16 个孔用于干扰素浓度待测的样品。去掉多余的微量板条块, 封于锡箔袋内置冰箱 (2-6℃) 待用。

25 (4) 精确汲取 100 μ l 步骤 (2) 中配制的 HIFN α 标准品稀释液及待测的样品稀释液, 加入到选定的微量板各复孔中 (包括标准品和待测的样品)。

30 (5) 加盖, 室温 (24℃) 下孵育 1h. 避免干燥及其他温度的影响。

(6) 此间, 可配制抗体溶液, 以便在步骤(8)中使用。为了避免丢失, 可先将抗体浓缩液(小瓶 D) 离心几秒钟, 使液体集中于瓶底。

方法:

- (高敏感度) 抗体浓缩液(小瓶 D) 6.7 μ l
 5 或(广范围) 抗体浓缩液(小瓶 D) 2.2 μ l
 加稀释缓冲液(C 瓶) 1 ml

此量为单排孔用量。复排用量倍增。

- (7) 孵育后, 去掉孔内液体, 用步骤(1)中配制的工作洗液冲洗每个孔一次。冲洗时每孔应充满。最好使用自动冲洗器(如 Nunc
 10 Immunowasher), 尽量不用手工操纵的移液器冲洗。冲洗后将微量板翻转, 置于脱纤维吸水纸上, 轻轻叩打, 令其干燥。样品中如含有害物质, 须采取防护措施。

(8) 冲洗后, 每孔加 100 μ l 步骤(6)中所配制的抗体溶液, 加盖, 室温下孵育 1h.。

- 15 (9)在此孵育期间, 配制浓缩的 HRP 溶液, 以便下一步步骤(10)使用。为了避免丢失, 可先将小瓶 E 离心几秒钟, 使液体集中于瓶底。具体配制方法如下:

HRP 原液(小瓶 E) 20 μ l

加入 HRP 稀释液(F 瓶) 140 μ l

- 20 轻轻混匀, 必要时可再次离心。此即浓缩的 HRP 溶液。

(10) 配制 HRP 稀释液:

取步骤(9)中所配制的浓缩的 HRP 溶液 1 μ l

(如为高敏) 加入(F 瓶) HRP 稀释液 1 ml 即成(高敏) 稀释液

(如为广范围) 则需将 HRP 浓缩液进一步稀释。

- 25 将经步骤(9)稀释的 HRP 溶液存放于-70℃待用, 未经稀释的 HRP 浓缩液则放在 4℃冰箱中。

(11) 孵育后, 去掉微量板孔内液体, 用步骤(1)中配制的工作洗液冲洗, 每个孔洗 3 次, 同步骤(7)。洗后, 将微量板翻转, 置于脱纤维吸水纸上, 轻轻叩打, 令其干燥。样品中如含有害物质, 须采取防护措施。

- 30 (12) 每孔加入稀释的 HRP 溶液 100 μ l, 封盖, 室温孵育 1h。

(13)室温下 (24℃) 预温 TMB 底物溶液 (G 瓶)。

(14) 孵育后去掉微量板孔内液体, 用步骤 (1) 中配制的工作洗液冲洗, 每个孔洗 4 次, 同步骤 (7), 去掉微量板孔内液体, 用步骤 (1) 中配制的工作洗液冲洗每个孔三次, 同步骤 (7)。洗后, 将微量板翻转, 置于脱纤维吸水纸上, 轻轻叩打, 令其干燥。样品中如含有害物质, 须采取防护措施。

(15) 每孔加 TMB 底物溶液 (G 瓶) 100 μ l, 封盖, 室温暗处孵育 15min.。

(16) 孵育后, 每孔加终止液 (H 瓶) 100 μ l, 涡旋或叩打轻轻, 令其混匀。

(17) 酶标仪于 450nm 处 5min 内测出吸收值。

(18) 绘出标准曲线。待测样品中 HIFN α 的滴度可从标准曲线上求出。所提供的标准曲线可供参考。

由于样品中干扰素的滴度是根据标准测得的, 因此其单位可以是 units/ml 或 pg/ml, 转换系数为 3 - 5 pg/unit。这个转换系数只是一个近似值。

三、结果见下表:

CpG	24h		48h	
	OD450	α 干扰素 (pg)	OD450	α 干扰素 (pg)
660	0.419	214.82	0.4335	223.3
661	0.207	90.795	0.195	83.775
662	0.212	93.72	0.276	131.16
663	0.159	62.715	0.117	38.145
664	0.883	486.26	0.899	495.62
665	0.2465	113.9	0.1675	67.688
666	0.0705	10.943	0.176	72.66
667	0.831	455.84	0.7505	408.74
668	0.4375	225.64	0.3865	195.8
669	0.19	80.85	0.18	75

I030021

670	0.227	102.5	0.2155	95.768
671	0.802	438.87	0.789	431.27
672	0.5065	266	0.475	247.58
673	0.3655	183.52	0.3595	180.01
674	0.233	106.01	0.23	104.25
675	0.471	245.24	0.5335	281.8
302	1.3785	776.12	1.227	687.5
647	0.074	12.99	0.08	16.5
TE	0.072	11.82	0.078	15.33

注：

CpG 纵列：CpG ODN 的编号，其序列如前文表所示。

24h OD450 纵列：代表用 CpG 纵列所示的 CpG ODN 刺激人外周血单
5 个核细胞 24h 收获上清中 α 干扰素测定实验中测得的光密度值（波长为 450nm）。

24h α 干扰素（pg）纵列：代表用 CpG 纵列所示的 CpG ODN 刺激人外周血单个核细胞 24h 收获上清中 α 干扰素的含量。

48h OD450 纵列：代表用 CpG 纵列所示的 CpG ODN 刺激人外周血单
10 个核细胞 48h 收获上清中 α 干扰素测定实验中测得的光密度值（波长为 450nm）。

48h α 干扰素（pg）纵列：代表用 CpG 纵列所示的 CpG ODN 刺激人外周血单个核细胞 48h 小时收获上清中 α 干扰素的含量。

I030021

SEQUENCE LISTING

5 <110> 长春华普生物技术有限公司

 <120> 抗病毒和抗肿瘤的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸

10

 <130> I030021

15

 <160> 107

20

 <170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1

 <211> 20

 <212> DNA

30

I030021

<213> Artificial

5 <400> 1

tcgtcgaggg cgccggtgac

20

<210> 2

10

<211> 20

<212> DNA

15 <213> Artificial

<400> 2

20 tcgtcgccgg tgggggtgtg

20

<210> 3

25 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

30

I030021

<400> 3

tcgtcgtacg caattgtctt

20

5

<210> 4

<211> 20

10

<212> DNA

<213> Artificial

15

<400> 4

tcgcctcgtc gccttcgagc

20

20

<210> 5

<211> 20

25

<212> DNA

<213> Artificial

30

I030021

<400> 5

tcgcccaccg gtgggggggg

20

5 <210> 6

<211> 21

<212> DNA

10

<213> Artificial

15 <400> 6

tcgtcgcaga ccggtctggg g

21

<210> 7

20

<211> 20

<212> DNA

25 <213> Artificial

<400> 7

30 gggggacgtc gccggggggg

20

I030021

<210> 8

5 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

10

<400> 8

ggatccgtac gcatgggggg

20

15

<210> 9

<211> 20

20

<212> DNA

<213> Artificial

25

<400> 9

tcgtcgcggc cggcgcccc

20

30

I030021

<210> 10

<211> 20

5 <212> DNA

<213> Artificial

10

<400> 10

tcgtcgcggc cgcgaggggg

20

15 <210> 11

<211> 25

<212> DNA

20

<213> Artificial

25 <400> 11

tcgtcggttac cgatgacgtc gccgt

25

<210> 12

30

I030021

<211> 26

<212> DNA

5 <213> Artificial

<400> 12

10 tcgtcgggtg cgacgtcgca gggggg

26

<210> 13

15 <211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

20

<400> 13

tcgtcgggtg cgacgatcgt cggggg

27

25

<210> 14

<211> 29

30

I030021

<212> DNA

<213> Artificial

5

<400> 14

tcgtcgtttg catcgatgca gtcgtcgtt

29

10

<210> 15

<211> 27

15 <212> DNA

<213> Artificial

20

<400> 15

tcgtcgtttg catcgatgca ggggggg

27

25 <210> 16

<211> 24

<212> DNA

30

I030021

<213> Artificial

5 <400> 16

accggtatcg atgccggtgg gggg

24

<210> 17

10

<211> 27

<212> DNA

15 <213> Artificial

<400> 17

20 ggggtccatg acgttcctga agggggg

27

<210> 18

25 <211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

30

I030021

<400> 18

tcgtcgtttt gacgatcgtc gggggg

26

5

<210> 19

<211> 30

10

<212> DNA

<213> Artificial

15

<400> 19

ttcgtcgttt gatcgatgtt cgttgggggg

30

20

<210> 20

<211> 24

25

<212> DNA

<213> Artificial

30

I030021

<400> 20

ttcgtcgttg tgatcgatgg gggg

24

5 <210> 21

<211> 28

<212> DNA

10

<213> Artificial

15 <400> 21

tatcgatgtt ttcgtcgtcg ttgggggg

28

<210> 22

20

<211> 28

<212> DNA

25 <213> Artificial

<400> 22

30 ttcgttgcac cgatgcacgc ttgggggg

28

I030021

<210> 23

5 <211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

10

<400> 23

ttcgcttcgc ttttcgcttc gctt

24

15

<210> 24

<211> 21

20

<212> DNA

<213> Artificial

25

<400> 24

tcgaggacaa gattctcgtg c

21

30

I030021

<210> 25

<211> 26

5 <212> DNA

<213> Artificial

10

<400> 25

tcgaggacaa gattctcgtg caggcc

26

15 <210> 26

<211> 21

<212> DNA

20

<213> Artificial

25 <400> 26

tcgtgcaggc caacgaggcc g

21

<210> 27

30

I030021

<211> 26

<212> DNA

5 <213> Artificial

<400> 27

10 accgccaagg agaagccgca ggaggg

26

<210> 28

15 <211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

20

<400> 28

tacaacggcg aggaatacc

19

25

<210> 29

<211> 30

30

I030021

<212> DNA

<213> Artificial

5

<400> 29

tcggcacgcg acgtgctggc cgtcgtttcc

30

10

<210> 30

<211> 21

15 <212> DNA

<213> Artificial

20

<400> 30

gtacaacggc gaggaatacc t

21

25 <210> 31

<211> 20

<212> DNA

30

I030021

<213> Artificial

5 <400> 31

accgtcggtg ccgtcggccc

20

<210> 32

10

<211> 14

<212> DNA

15 <213> Artificial

<400> 32

20 tgctggccgt cggt

14

<210> 33

25 <211> 14

<212> DNA

<213> Artificial

30

I030021

<400> 33

gtcggcacgc gacg

14

5

<210> 34

<211> 19

10

<212> DNA

<213> Artificial

15

<400> 34

gtcggcacgc gacggggggg

19

20

<210> 35

<211> 20

25 <212> DNA

<213> Artificial

30

I030021

<400> 35

gtcggcacgc gacgcccccc

20

5 <210> 36

<211> 22

<212> DNA

10

<213> Artificial

15 <400> 36

tcgttgccgt cggccccccc cc

22

<210> 37

20

<211> 19

<212> DNA

25 <213> Artificial

<400> 37

30 tcgttgccgt cggccccccc

19

I030021

<210> 38

5 <211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

10

<400> 38

tcgttgccgt cggccccc

18

15

<210> 39

<211> 17

20

<212> DNA

<213> Artificial

25

<400> 39

tcgttgccgt cggccccc

17

30

I030021

<210> 40

<211> 20

5 <212> DNA

<213> Artificial

10

<400> 40

tcgttgccgt cggccccccc 20

15 <210> 41

<211> 13

<212> DNA

20

<213> Artificial

25 <400> 41

tcgttgccgt cgg 13

<210> 42

30

I030021

<211> 14

<212> DNA

5 <213> Artificial

<400> 42

10 tcgttgccgt cggg

14

<210> 43

15 <211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

20

<400> 43

tcgttgccgt cgggg

15

25

<210> 44

<211> 16

30

I030021

<212> DNA

<213> Artificial

5

<400> 44

tcgttgccgt cggggg

16

10

<210> 45

<211> 17

15 <212> DNA

<213> Artificial

20

<400> 45

tcgttgccgt cggggg

17

25 <210> 46

<211> 18

<212> DNA

30

I030021

<213> Artificial

5 <400> 46

tcgttgccgt cggggggg

18

<210> 47

10

<211> 19

<212> DNA

15 <213> Artificial

<400> 47

20 tcgttgccgt cggggggg

19

<210> 48

25 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

30

I030021

<400> 48

tcgttgccgt cggggggggg

20

5

<210> 49

<211> 19

10

<212> DNA

<213> Artificial

15

<400> 49

tcgaggacaa gattctcgt

19

20

<210> 50

<211> 14

25

<212> DNA

<213> Artificial

30

	I030021	
	<400> 50	
	tcccgcctgga cggtt	14
5	<210> 51	
	<211> 27	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial	
15	<400> 51	
	tcggcacgcg acgtgctggc cgtcggt	27
	<210> 52	
20	<211> 21	
	<212> DNA	
25	<213> Artificial	
	<400> 52	
30	tcgtcgcgcc gtcacggggg g	21

I030021

<210> 53

5 <211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

10

<400> 53

tcgtgtgcgt gccgttggg

19

15

<210> 54

<211> 18

20

<212> DNA

<213> Artificial

25

<400> 54

tcgtcgccgt tgggcggg

18

30

I030021

<210> 55

<211> 21

5 <212> DNA

<213> Artificial

10

<400> 55

tcgtcgacgt cgttgggcgg g

21

15 <210> 56

<211> 26

<212> DNA

20

<213> Artificial

25 <400> 56

tcgcagttgt cgtaacgttg ggcggg

26

<210> 57

30

I030021

<211> 23

<212> DNA

5 <213> Artificial

<400> 57

10 ttaccggtta acgttgccg gcc

23

<210> 58

15 <211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

20

<400> 58

accggttaac gttgtccccg ggg

23

25

<210> 59

<211> 16

30

I030021

<212> DNA

<213> Artificial

5

<400> 59

tcgtcgttgg tatgtt

16

10

<210> 60

<211> 20

15 <212> DNA

<213> Artificial

20

<400> 60

tcgtcgtcgt cgttgcgtt

20

25 <210> 61

<211> 24

<212> DNA

30

I030021

<213> Artificial

5 <400> 61

tcgtcgtcgt cgttgtcgtt gggg

24

<210> 62

10

<211> 15

<212> DNA

15 <213> Artificial

<400> 62

20 tcgttcgggg tgccg

15

<210> 63

25 <211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

30

I030021

<400> 63

tcgttcgggg taacgatt

18

5

<210> 64

<211> 17

10

<212> DNA

<213> Artificial

15

<400> 64

tcgttcgggg taacgtt

17

20

<210> 65

<211> 17

25

<212> DNA

<213> Artificial

30

I030021

<400> 65

tcgttcgggg taccgat

17

5 <210> 66

<211> 21

<212> DNA

10

<213> Artificial

15 <400> 66

tcgttcgggg taccgatggg g

21

<210> 67

20

<211> 24

<212> DNA

25 <213> Artificial

<400> 67

30 tcgttcgct .cccatgccgg gggg

24

I030021

<210> 68

5 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

10

<400> 68

tcgtcgtttc gtcgttgggg

20

15

<210> 69

<211> 27

20

<212> DNA

<213> Artificial

25

<400> 69

tcgttgctcgt ttcgctgccg gcggggg

27

30

I030021

<210> 70

<211> 24

5 <212> DNA

<213> Artificial

10

<400> 70

cgttgacgat cgtcccatgg cggg

24

15 <210> 71

<211> 16

<212> DNA

20

<213> Artificial

25 <400> 71

tctgcggcct tcgtcg

16

<210> 72

30

I030021

<211> 22

<212> DNA

5 <213> Artificial

<400> 72

10 tagtaaccgg tccggcgccc cc

22

<210> 73

15 <211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

20

<400> 73

ttgcagcgct gccggtggg

19

25

<210> 74

<211> 23

30

I030021

<212> DNA

<213> Artificial

5

<400> 74

tcgtacggcc gccgtacggc ggg

23

10

<210> 75

<211> 21

15 <212> DNA

<213> Artificial

20

<400> 75

cggcccatcg agggcgacgg c

21

25 <210> 76

<211> 23

<212> DNA

30

I030021

<213> Artificial

5 <400> 76

tcgcgtcgac tcccctcgag ggg

23

<210> 77

10

<211> 24

<212> DNA

15 <213> Artificial

<400> 77

20 tcgtcgtcga ctggtggtcg gggg

24

<210> 78

25 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

30

I030021

<400> 78

tcgggcgccc gatcgggggg

20

5

<210> 79

<211> 19

10

<212> DNA

<213> Artificial

15

<400> 79

tcgtcgggtct ttcgaaatt

19

20

<210> 80

<211> 18

25 <212> DNA

<213> Artificial

30

I030021

<400> 80

tcgtgacgtc ctcgagtt

18

5 <210> 81

<211> 16

<212> DNA

10

<213> Artificial

15 <400> 81

tcgttgccgt cggccc

16

<210> 82

20

<211> 20

<212> DNA

25 <213> Artificial

<400> 82

30 ggacgatcga tcgtgggggg

20

I030021

<210> 83

5 <211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

10

<400> 83

gggatgcatc gatgcatcgg gggg

24

15

<210> 84

<211> 20

20

<212> DNA

<213> Artificial

25

<400> 84

gggggaatcg attcgggggg

20

30

I030021

<210> 85

<211> 20

5 <212> DNA

<213> Artificial

10

<400> 85

ggtgacgacgt cgcagggggg

20

15 <210> 86

<211> 26

<212> DNA

20

<213> Artificial

25 <400> 86

tcgtcgggtg catcgatgca gggggg

26

<210> 87

30

I030021

<211> 24

<212> DNA

5 <213> Artificial

<400> 87

10 ggtgcatcgt acgatgcagg gggg

24

<210> 88

15 <211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

20

<400> 88

gggacgtacg tcgggggg

18

25

<210> 89

<211> 21

30

I030021

<212> DNA

<213> Artificial

5

<400> 89

tcggggacga tcgtcggggg g

21

10

<210> 90

<211> 24

15 <212> DNA

<213> Artificial

20

<400> 90

gggggatcga tatcgatcgg gggg

24

25 <210> 91

<211> 24

<212> DNA

30

I030021

<213> Artificial

5 <400> 91

gggggatcga cgtcgatcgg gggg

24

<210> 92

10

<211> 24

<212> DNA

15 <213> Artificial

<400> 92

20 ggtgcatcga tcgatgcagg gggg

24

<210> 93

25 <211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

30

I030021

<400> 93

ggatcgcgatcg atcgcgatgggg gg

22

5

<210> 94

<211> 22

10

<212> DNA

<213> Artificial

15

<400> 94

ggcgcgatcgat cgcgcggggg gg

22

20

<210> 95

<211> 22

25

<212> DNA

<213> Artificial

30

I030021

<400> 95

ggggtcgcgc gatcgagggg gg

22

5 <210> 96

<211> 22

<212> DNA

10

<213> Artificial

15 <400> 96

ggtgcgcgcgc atcgagggg gg

22

<210> 97

20

<211> 20

<212> DNA

25 <213> Artificial

<400> 97

30 ggtgcgcgcgc gcgagggggg

20

1030021

<210> 98

5 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

10

<400> 98

tcgtctttcg actcgttctc

20

15

<210> 99

<211> 18

20

<212> DNA

<213> Artificial

25

<400> 99

tcgtcgtttt gcgttctc

18

30

I030021

<210> 100

<211> 20

5 <212> DNA

<213> Artificial

10

<400> 100

tcacgcgactc tcgagcgttc

20

15 <210> 101

<211> 21

<212> DNA

20

<213> Artificial

25 <400> 101

atcgtcgact ctcgtgttct c

21

<210> 102

30

I030021

<211> 20

<212> DNA

5 <213> Artificial

<400> 102

10 tcgactttcg tcgttctgtt

20

<210> 103

15 <211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

20

<400> 103

tcgtcgtttc gtcgttctc

19

25

<210> 104

<211> 20

30

I030021

<212> DNA

<213> Artificial

5

<400> 104

tcgtcgtcgt cgttgcgtt

20

10

<210> 105

<211> 19

15 <212> DNA

<213> Artificial

20

<400> 105

tcgttctcga ctcgttctc

19

25 <210> 106

<211> 23

<212> DNA

30

I030021

<213> Artificial

5 <400> 106

tcgacgttcg tcgttcgtcg ttc

23

<210> 107

10

<211> 21

<212> DNA

15 <213> Artificial

<400> 107

20 tcgtcgacgt cggttcgttct c

21